

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-222611

(43)Date of publication of application : 08.08.2003

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

G01N 30/48

G01N 30/60

G01N 30/88

G01N 37/00

(21)Application number : 2002-337304

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 20.11.2002

(72)Inventor : IIDA KAZUHIRO
BABA MASAKAZU
KAWAURA HISAO
SANO TORU
SAKAMOTO TOSHIMORI
IGUCHI NORIYUKI
SOMEYA HIROKO

(30)Priority

Priority number : 2001355298

Priority date : 20.11.2001

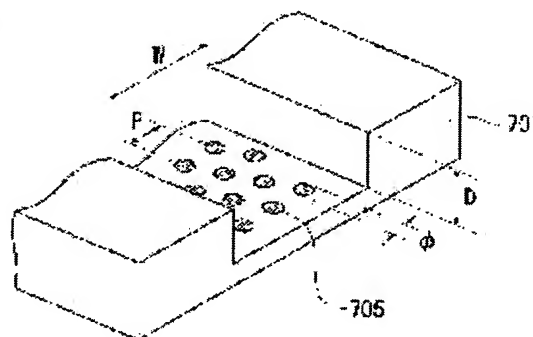
Priority country : JP

(54) SEPARATING APPARATUS AND METHOD THEREFOR, AND MANUFACTURING METHOD THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a separating technique that can quickly separate a sample with improved resolution by a small amount of sample and has less problems of blocking or the like.

SOLUTION: Many hydrophobic regions 705 are arranged at a channel where a sample passes at an nearly equal interval, and a region other than the hydrophobic regions 705 is in structure where the surface of a hydrophilic substrate 701 is exposed.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

14.10.2005

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-222611

(P 2 0 0 3 - 2 2 2 6 1 1 A)

(43) 公開日 平成15年8月8日 (2003. 8. 8)

(51) Int. Cl.

G01N 27/447

30/48

30/60

30/88

識別記号

ZNM

F I

G01N 30/48

30/60

30/88

ZNM

Z

D

E

J

データベース (参考)

37/00

101

審査請求 未請求 請求項の数24 O L (全18頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-337304 (P 2002-337304)

(22) 出願日 平成14年11月20日 (2002. 11. 20)

(31) 優先権主張番号 特願2001-355298 (P 2001-355298)

(32) 優先日 平成13年11月20日 (2001. 11. 20)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004237

日本電気株式会社

東京都港区芝五丁目7番1号

(72) 発明者 飯田 一浩

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株

式会社内

(72) 発明者 馬場 雅和

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株

式会社内

(74) 代理人 100110928

弁理士 速水 進治

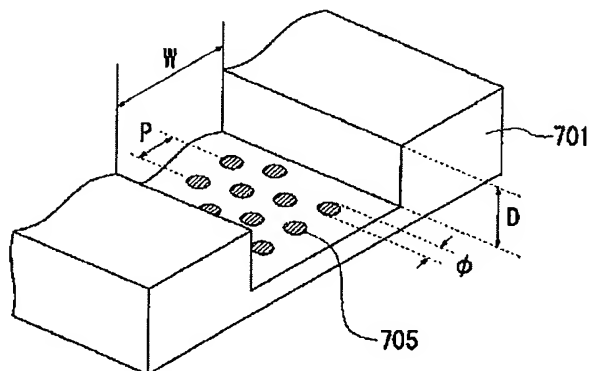
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分離装置、分離方法および分離装置の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 少量の試料で短時間に優れた分解能で試料を分離でき、目詰まり等の問題も少ない分離技術を提供する。

【解決手段】 試料の通る流路に、多数の疎水性領域705を略等間隔で配設し、疎水性領域705以外の領域は親水性基板701の表面が露出した構造とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路に設けられた試料導入部および試料分離部とを備える分離装置であって、前記試料分離部の表面は、親水性領域と疎水性領域とを有することを特徴とする分離装置。

【請求項 2】 基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路に設けられた試料導入部および試料排出部と、試料導入部から試料排出部に至るまでの間の流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置であって、前記試料分離部の表面は、離間して配置された複数の第一の領域と、該第一の領域を除く試料分離部表面を占める第二の領域と、を有し、第一の領域および第二の領域のうち、一方が疎水性領域であり、他方が親水性領域であることを特徴とする分離装置。

【請求項 3】 請求項 2 に記載の分離装置において、前記第一の領域が 2 次元的に略等間隔で配置されていることを特徴とする分離装置。

【請求項 4】 請求項 2 または 3 に記載の分離装置において、前記試料分離部を複数備えたことを特徴とする分離装置。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の分離装置において、隣接する試料分離部の間隔が、各試料分離部を構成する第一の領域の間隔よりも広いことを特徴とする分離装置。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 に記載の分離装置において、各試料分離部における第一の領域の間隔が互いに異なることを特徴とする分離装置。

【請求項 7】 請求項 1 乃至 6 いずれかに記載の分離装置において、外力付与手段をさらに備え、外力により前記試料を試料導入部から前記試料分離部の方向へ移動せしめるようにしたことを特徴とする分離装置。

【請求項 8】 請求項 1 乃至 7 いずれかに記載の分離装置において、前記試料分離部の下流側に検出部を備えたことを特徴とする分離装置。

【請求項 9】 請求項 1 乃至 8 いずれかに記載の分離装置において、前記疎水性領域は、疎水基を有する化合物を含む膜により構成されたことを特徴とする分離装置。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の分離装置において、前記疎水基を有する化合物は、疎水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置。

【請求項 11】 請求項 9 または 10 に記載の分離装置において、前記疎水基はチオール基であることを特徴とする分離装置。

【請求項 12】 請求項 1 乃至 8 いずれかに記載の分離装置において、前記疎水性領域は、シリコン化合物を含むことを特徴とする分離装置。

【請求項 13】 請求項 1 乃至 12 いずれかに記載の分離装置において、前記親水性領域は、親水基を有する化合物を含む膜により構成されたことを特徴とする分離装置。

【請求項 14】 請求項 13 に記載の分離装置において、前記親水基を有する化合物は、親水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置。

【請求項 15】 請求項 14 に記載の分離装置において、前記シランカップリング剤はアミノ基を有する化合物であることを特徴とする分離装置。

【請求項 16】 請求項 1 乃至 15 いずれかに記載の分離装置を用い、前記試料導入部から試料を導入し、試料中の所定成分を分離することを特徴とする試料分離方法。

【請求項 17】 基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、親水性表面を有する前記流路を形成する工程と、前記流路の表面の少なくとも一部に、開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に疎水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、疎水性領域が配置された前記試料分離部を形成する工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法。

【請求項 18】 請求項 17 に記載の分離装置の製造方法において、前記化合物は、疎水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置の製造方法。

【請求項 19】 請求項 18 に記載の分離装置の製造方法において、前記疎水基はチオール基であることを特徴とする分離装置の製造方法。

【請求項 20】 基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、疎水性表面を有する基板に前記流路を形成する工程と、前記流路の表面の少なくとも一部に開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に親水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、親水性領域が配置された前記試料分離部を形成する工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の分離装置の製造方法において、前記化合物は、親水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置の製造方法。

【請求項 22】 請求項 21 に記載の分離装置の製造方法において、前記親水基はアミノ基であることを特徴とする分離装置の製造方法。

【請求項 23】 基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、親水性表面を有する前記流路を形成する工程と、前記流路の表面に対して液状シリコン化合物を付着し、疎水性領域が配置された前記試料分離部を形成する

工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法。

【請求項24】 請求項23に記載の分離装置の製造方法において、

前記試料分離部を形成する前記工程は、前記液状シリコン化合物を含有するシリコン樹脂の表面を前記前記流路表面に接触させる工程を含むことを特徴とする分離装置の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、大きさや極性、水に対する親和力等の異なる試料を分離する装置および分離方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 核酸やタンパク質の分析では、試料をあらかじめ分離精製したり、試料をサイズや電荷に応じて分離・分析する操作が頻繁に行われる。たとえば塩基配列決定法として広く利用されているマクサム・ギルバート法においては、DNAの一端を³²Pで標識し、これをさまざまな長さの断片が得られるように化学的に分解した後、電気泳動にかけて分離し、その後オートラジオグラフィを行って塩基配列を読み取るというプロセスが行われる。こうした分離操作は分析時間の長短を決定する重要な因子となっており、分離に要する時間を短縮することはこの分野における重要な技術的課題となっている。かかる技術的課題を解決するため、短時間で所望の物質を正確に分離できる分離装置の開発が望まれている。

【0003】 このような分離装置として、従来、キャピラリー電気泳動装置が広く用いられてきた。しかしながらキャピラリー電気泳動は、測定に長時間を要する上、試料が大量に必要となる。また、分解能についても必ずしも満足できる水準にはない。

【0004】 一方、目的物質を分離する装置として、米国特許5,837,115号(特許文献1)には、多数の障害物をアレイ状に配置した分離装置が開示されている。分離対象としては、細胞やウイルス、巨大分子、微小粒子等が例示されている。

【0005】

【特許文献1】 米国特許5,837,115号明細書

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながらこの技術は、以下の点でなお改善の余地を有していた。第一に、巨大分子や粒子が原因となって目詰まりが生じる場合があり、スループットの向上に限界があった。第二に、多数の障害物の加工には製造コストがかかるという問題があった。

【0007】 本発明は上記事情に鑑みなされたものであって、少量の試料で所望の物質を短時間で正確に分離することのできる分離装置および分離方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、流路に設けられた試料導入部および試料分離部とを備える分離装置であって、試料分離部の表面は、親水性領域と疎水性領域とを有することを特徴とする分離装置が提供される。

【0009】 本発明によれば、基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、流路に設けられた試料導入部および試料排出部と、試料導入部から試料排出部に至るまでの間の流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置であって、試料分離部の表面は、離間して配置された複数の第一の領域と、該第一の領域を除く試料分離部表面を占める第二の領域と、を有し、第一の領域および第二の領域のうち、一方が疎水性領域であり、他方が親水性領域であることを特徴とする分離装置が提供される。

【0010】 この分離装置において、第一の領域が2次元的に略等間隔で配置された構成とすることができる。すなわち、第一の領域を、縦横方向にほぼ等間隔で規則正しく配置された状態とすることができる。この分離装置において、外力付与手段をさらに備え、外力により前記試料を試料導入部から試料排出部へ移動せしめるようにした構成とすることもできる。外力の種類は、電界、表面張力、圧力等を用いることができ、外力付与手段としては、電圧印加部、ポンプ等を例示できる。外力の種類として表面張力を選択した場合は、特別な外力付与手段を設けなくてもよい。

【0011】 本発明の分離装置によれば、

(i) 第一の領域を疎水性領域とし、第二の領域を親水性領域とする構成

(ii) 第一の領域を親水性領域とし、第二の領域を疎水性領域とする構成

のいずれかを採用することができる。なお、本発明における親水性領域とは、疎水性領域よりも親水性が高いことをいう。親水性の程度はたとえば水接触角の測定により把握することができる。

【0012】 以下、本発明に係る分離装置の原理について、上記(i)の場合を例に挙げて説明する。この場合、

分離対象となる試料を、比較的親水性の高い溶媒中に溶解または分散させた状態として装置内に導入する。このような溶媒は、試料分離部において、疎水性領域(第一の領域)の表面を避け親水性領域(第二の領域)にのみ分布する。したがって、疎水性領域の間隙部が分離対象となる試料の通過する経路となり、この結果、疎水性領域間の間隔と試料のサイズとの関係によって試料分離部の通過に要する時間が決定されることとなる。これにより、サイズに応じて試料の分離がなされる。

【0013】 一方、本発明においては、サイズに応じた分離のほか試料の極性に応じた分離もなされる。すなわ

ち、親水性／疎水性の程度の異なる複数種類の試料を分離することができる。上記(i)の例では、疎水性の高い試料は疎水性領域に捕捉されやすく流出時間が比較的長くなる一方、親水性の高い試料は疎水性領域に捕捉されにくく、流出時間が比較的短くなる。このように本発明は、試料のサイズだけでなく極性をも含めた分離がなされ、従来では分離困難であった多成分系の分離を実現することができる。

【0014】本発明に係る分離装置は、障害物となる構造体により分離を行う方式とは異なり、流路表面に設けられた試料分離部を分離手段とする。膜分離の場合は膜中の細孔の大きさを精度良く制御することが必要となるが、所望のサイズ、形状の細孔を有する膜を安定的に製造することは必ずしも容易ではない。これに対し本発明は、流路の表面処理により試料分離部を形成することができ、第一の領域の間隔を制御することによって所望の分離性能が得られるため、分離目的に応じた適切な装置構成を比較的容易に実現することができる。たとえば、本発明の装置の試料分離部は、マスク開口部に疎水基を有する化合物を堆積することで作製することができ、この場合、マスク開口幅を調整することで容易に疎水領域間の間隔を調整できる。すなわち、分離目的に応じて疎水領域間の間隔を適宜に調整し、分離目的に応じた試料分離部の構成とすることができる。特に、タンパク質やDNAの分離においては、巨大サイズの物質の分離からナノオーダーの物質の分離まで、様々なサイズの物質の分離が求められる。このうちナノオーダーの物質を高い分離能で短時間で分離を行うことは、従来技術ではきわめて困難であった。本発明に係る分離装置では、第一の領域間の間隔を狭くすることで分離サイズを狭くすることができる。第一の領域間の間隔は、微細加工技術を利用することにより容易に実現できることから、ナノオーダーサイズの物質の分離を好適に実現することができる。

【0015】また本発明に係る分離装置によれば、少量の試料で短時間に分離を行うことができる。本発明による分離は、試料分離部の表面特性によって分離を行うものであるため、精密な分離を実現できる上、試料のロスが少ないので、少量の試料でも十分に高い分解能を実現でき、また、優れた分解能を実現することができるのである。さらに本発明に係る分離装置は、試料を通過する流路の表面特性によって分離が行われるため、目詰まり等の問題が少ない。また、使用後、試料分離部の表面に洗浄液を流す等の方法によってきわめて容易に洗浄することができる。

【0016】本発明の分離装置は、隣接する第一の領域間の距離と、液体に含まれる分離対象の試料サイズとの関係により、様々な機能の分離を実現することができる。試料サイズが上記距離よりも大きい場合、この分離装置は試料濃縮装置としての機能を果たす。試料分離部

はフィルタとして作用し、試料分離部上流側で当該試料がせき止められる。この結果、試料分離部上流側において試料が高濃度に濃縮される。

【0017】一方、試料サイズが上記距離よりも小さい場合、試料分離部は試料分別機能を果たし、試料分離部中において、サイズや親水性の程度等に応じて試料が分別される。この結果、試料分離部下流側に、分別された試料が流出することとなる。

【0018】さらに本発明によれば、上記分離装置を用い、前記試料導入部から試料を導入し、試料中の所定成分を分離することを特徴とする試料分離方法が提供される。

【0019】この試料分離方法によれば、目詰まり等の問題を解消しつつ高精度の試料分離を実現することができる。

【0020】また本発明によれば、基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、親水性表面を有する流路を形成する工程と、流路の表面の少なくとも一部に、開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から流路表面に疎水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、疎水性領域が配置された試料分離部を形成する工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法が提供される。ここで、流路は、親水性表面を有する基板に溝を形成することにより設けることもできる。また、試料分離部を形成する工程において、流路の側壁となる疎水性領域をも同時に形成することもできる。さらに、試料分離部の疎水性領域は、複数の疎水性領域が離間して配置された構成とすることもできる。この場合、マスクは複数の開口部を有するように形成することができる。上記製造方法によれば、疎水表面および親水表面の混在したパターンを、歩留まり良く高精度に作製することができる。この分離装置の製造方法において、第一の領域が2次元的に略等間隔で配置された構成とすることができる。すなわち、第一の領域を、縦横方向にほぼ等間隔で規則正しく配置された状態とすることができる。

【0021】また本発明によれば、基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、疎水性表面を有する基板に流路を形成する工程と、流路の表面の少なくとも一部に開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から流路表面に親水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、親水性領域が配置された試料分離部を形成する工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法が提供される。ここで、流路は、疎水性表面を有する基板に溝を形成することにより設けることもできる。さらに、試料分離部の親水性領域は、複数の親水性領域が離間して配置された構成とすることもできる。この場合、マスクは複数の開口

部を有するように形成することができる。上記製造方法によれば、疎水表面および親水表面の混在したパターンを、歩留まり良く高精度に作製することができる。この分離装置の製造方法において、第一の領域が2次的に略等間隔で配置された構成とすることができる。すなわち、第一の領域を、縦横方向にほぼ等間隔で規則正しく配置された状態とすることができる。疎水基を有する化合物および親水基を有する化合物は、たとえばシランカップリング剤を用いることができる。

【0022】本発明によれば、基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、親水性表面を有する流路を形成する工程と、流路の表面に対して液状シリコン化合物を付着し、疎水性領域が配置された試料分離部を形成する工程と、を含むことを特徴とする分離装置の製造方法が提供される。ここで、流路は、親水性表面を有する基板に溝を形成することにより設けることもできる。また、試料分離部を形成する工程において、流路の側壁となる疎水性領域をも同時に形成することもできる。さらに、試料分離部の疎水性領域は、複数の疎水性領域が離間して配置された構成とすることもできる。この場合、マスクは複数の開口部を有するように形成することができる。上記製造方法によれば、疎水表面および親水表面の混在したパターンを、容易に高精度に作製することができる。

【0023】本発明のこの製造方法において、試料分離部を形成する工程は、液状シリコン化合物を含有するシリコン樹脂の表面を流路表面に接触させる工程を含む構成とすることができる。ここで、液状シリコン化合物として、たとえばシリコンオイルを用いることができる。この方法によれば、簡便な工程で、疎水表面および親水表面の混在したパターンを形成することができる。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明において、試料分離部は、親水性表面を有する基板の一部を疎水処理する、疎水性表面を有する基板の一部を親水処理するといった方法で作製できるほか、基板表面に疎水処理と親水処理の両方の処理を行うことにより作製することもできる。

【0025】親水性表面を有する基板としては、石英基板やガラス基板等を用いることができる。疎水性表面を有する基板としては、シリコン樹脂、ポリエチレン樹脂等の樹脂基板を用いることができる。

【0026】疎水処理や親水処理は、分子中に、基板材料と吸着ないし化学結合するユニットと、疎水性または親水性の装飾基を有するユニットとを併せ持つ構造の化合物を、基板表面に付着ないし結合させること等により実現される。こうした化合物として、たとえばシランカップリング剤等を用いることができる。

【0027】シランカップリング剤としては、ビニルト

リクロルシラン、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、 β -(3,4エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、 γ -メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -クロロプロピルトリメトキシシラン、 γ -メルカプトプロピルトリメトキシシラン、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン、3-トリエトキシシリル-N- (1,3-ジメチル- β -チリデン)、3-チオールプロピルトリエトキシシラン等が挙げられる。

【0028】上記のうち、親水性基を有するシランカップリング剤として好ましいものは、アミノ基を有するものが挙げられ、具体的にはN- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- γ -アミノプロピルトリメトキシシラン等が挙げられる。

【0029】また、疎水基を有するシランカップリング剤として好ましいものは、チオール基を有するものが挙げられ、具体的には3-チオールプロピルトリエトキシシラン等が挙げられる。

【0030】カップリング剤液等の塗布方法としては、スピンコート法、スプレー法、ディップ法、気相法等が用いられる。スピンコート法とは、カップリング剤等、結合層の構成材料を溶解または分散させた液をスピンコーターにより塗布する方法である。この方法によれば膜厚制御性が良好となる。また、スプレー法とはカップリング剤液等を基板に向けてスプレー噴霧する方法であり、ディップ法とは基板をカップリング剤液等に浸漬する方法である。これらの方法によれば、特殊な装置を必要とせず、簡便な工程で膜を形成することができる。また気相法とは、基板を必要に応じて加熱し、ここにカップリング剤液等の蒸気を流動させる方法である。この方法によっても膜厚の薄い膜を膜厚制御性良く形成することができる。このうち、シランカップリング剤溶液をスピンコートする方法が好ましく用いられる。優れた密着性が安定的に得られるからである。この際、溶液中のシ

ランカップリング剤濃度は、好ましくは0.01~5 v/v%、より好ましくは0.05~1 v/v%とする。シランカップリング剤溶液の溶媒としては、純水；メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール；酢酸エチル等のエステル類等を単独または2種以上を混合して使用できる。このうち、純水で希釈したエタノール、メタノール、および酢酸エチルが好ましい。密着性の向上効果が特に顕著となるからである。カップリング剤等を塗布した後は、乾燥を行う。乾燥温度は特に制限がないが、通常、室温（25℃）~170℃の範囲で行う。乾燥時間は、温度にもよるが、通常は0.5~24時間とする。乾燥は空気中で行っても良いが、窒素等の不活性ガス中で乾燥させてもよい。たとえば、窒素を基板に吹き付けながら乾燥させる窒素ブロー法を用いることもできる。

【0031】本発明において、第一の領域の形状は特に制限がなく、円形、楕円形、四角形、三角形等、さまざまな形状を含む。また、疎水表面処理により所定の高さの凸状の形状を有していても良い。第一の領域のサイズも特に制限がなく、分離装置の目的および用途に応じて適宜に選択される。本発明の分離装置は、流体中にサイズや極性の異なる資料の分離・精製に好適に用いることができる。特に生体物質の分離処理を行うのに適している。たとえば、人間や他の動物の血液や唾液等を試料とし、以下の成分の分離・濃縮に用いるのに適している。

(i)細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮

(iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮

(iv)高分子の分解産物と未分解産物の分離

本発明に係る分離装置は、微小サイズの物質の分離も可能であり、様々なサイズの核酸断片をはじめとする核酸、あるいは、アミノ酸・ペプチド・タンパク質などの有機分子、金属イオンなど等の分離・精製に適用することもできる。本発明における第一の領域の間隔は、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、

(i)細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮

(iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮

といった処理において、(i)の場合、1μm~10μm、(ii)の場合、100nm~1μm、(iii)の場合、1nm~100nm、とする。

【0032】本発明の分離装置は、試料分離部の下流側

に検出部を設けて分析装置とすることができる。また、試料排出部から所定の成分を分取する構成とすることもできる。

【0033】本発明において、第一の領域の間隔は分離目的に応じて適宜に設定される。たとえば100nm以下とすることも可能である。疎水性領域は、電子線露光等のリソグラフィ技術を利用した成膜プロセスにより作製することができるので、100nm以下、さらには50nm以下のものも実現することができる。これにより、従来困難であった成分の分離を実現することができる。

【0034】本発明の分離装置において、試料分離部を複数含み、隣接する試料分離部間に試料が通過するパスが設けられた構成を採用することができる。このような構成を採用した場合、通常分子篩とは異なる原理で試料が分離される。本発明の分離装置では、試料のサイズと親水性/疎水性、水に対する親和性、極性の両面による分離が可能であるが、以下、サイズによる分離について着目して説明する。通常分子篩では、分子サイズの大きい物質ほど、篩によって通過を阻害される程度が大きくなる。したがって、大きいサイズの物質は、小さいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。これに対して本発明の装置は、試料の大きさが小さいほど、試料分離部中で長い経路を通ることになるため、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。サイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過する方式となる。この結果、分離操作におけるスループットが顕著に改善される。特に核酸やタンパク質等の分離においては、分子の慣性半径もきわめて広い範囲に及ぶため、巨大サイズの物質が原因となって分離効率が低下しやすい。本発明によれば、このような問題が解決されるため、核酸やタンパク質等の分離に好適に適用できる。

【0035】この発明において、試料分離部間のパスの幅は、試料分離部中の疎水性領域間の平均間隔よりも大きい構成とすることができる。このようにすれば、大きいサイズの物質は試料分離部中のパスの部分で円滑に通過するとともに、小さいサイズの物質は試料分離部を通り、そのサイズに応じて長い経路を経た末に試料分離部を通過することとなる。この結果、上記したような大きいサイズの物質が小さいサイズの物質よりも後から排出される形の分離が、より円滑になされる。

【0036】ここで、試料分離部中の第一の領域間の間隔は、試料分離部ごとに任意の値に設定することができる。したがってこの発明においては、試料分離部中の第一の領域間の距離および上記パスの幅の2種類のパラメータを任意に設定でき、これにより、サイズの分布が広い試料についても、目詰まりの発生やスループットの低下をもたらすことなく高い分解能で分離することができる。たとえば、小さいサイズの分子を高い分解能で分離

するために、第一の領域間の間隔を数ナノ〜数十ナノメートルオーダーと狭くする一方、上記試料分離部中のパスの幅を大きくすることによって大きいサイズの分子を円滑に移動させ、目詰まりや分離効率の低下を防止することができる。

【0037】各試料分離部を構成する第一の領域は、略同サイズで等間隔に形成されたものとしてすることができる。このようにすれば、試料分離部における分離の感度を高めることができる。試料分離部内の第一の領域が多数になると、分解能が向上する。

【0038】試料分離部は、それぞれ異なるサイズの第一の領域により構成してもよい。すなわち、各試料分離部中に、それぞれ異なるサイズおよび間隔で第一の領域が形成された構成を採用することもできる。このようにすれば、サイズの分布がきわめて広い試料についても、目詰まりの発生やスループットの低下をもたらすことなく高い分解能で分離することができる。

【0039】本発明の分離装置において、上記試料に外力を付与して上記試料を上記流路中で移動せしめる外力付与手段をさらに備えた構成を採用することができる。20 このようにすれば、外力を負荷する程度に応じて分離精度および分離に要する時間を目的に応じて適切に設定することができる。ここで、外力としては、圧力や電界を用いることが便利である。大がかりな外力付与部材が不要だからである。また、毛細管現象を利用して試料を移動させることもできる。この場合、外力付与手段が不要となり、装置の小型化に有利となる。

【0040】本発明の分離装置において分離対象となる試料としては、

(i)細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物(細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体)と液状分画(細胞質)の分離、濃縮

(iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分(DNA、RNA、タンパク質、糖鎖)と低分子量成分(ステロイド、ブドウ糖等)の分離、濃縮

(iv)高分子の分解産物と未分解産物の分離

等が挙げられる。微小スケールのものについては、核酸断片をはじめとする核酸、あるいは、アミノ酸・ペプチド・タンパク質などの有機分子、金属イオンなどが挙げられる。このうち、たとえば核酸またはタンパク質を試料とした場合、より効果的である。これらの試料の分離に際しては、小さいサイズの分子を高い分解能で分離しなければならないため、数ナノ〜数十ナノメートルオーダーの微小な間隔が設けられた構造が必須となる。一方、巨大物質による目詰まりを効果的に抑制することも要求される。本発明によれば、これらの要求の双方に充分に対応できるため、核酸またはタンパク質の分離に好適である。

【0041】上記分離装置において、流路の断面全体に 50

わたって形成された前記試料分離部が、スリットを介して複数設けられた構成とすることができる。このような構成とすることにより、検出部でのバンドの形状が直線的となり、検出領域を広げることが可能となり検出感度を向上することができる。

【0042】なお、本発明における分離装置は、試料分離部を備えているものであればよく、サンプル導入領域や外力付与手段は装置自体に備わっていなくてもよい。たとえば、本発明における分離装置を使い捨て型のカートリッジタイプとし、これを、所定のユニットに組み込んで使用する方式とすることもできる。

【0043】以下、図面を参照して本発明の実施の形態についてさらに説明する。

【0044】図1は、本発明に係る分離装置の一例を示す図である。基板110上に分離用流路112が形成され、これと交差するように投入用流路111および回収用流路114が形成されている。投入用流路111、分離用流路112および回収用流路114には、それぞれその両端に液溜め101a、101b、102a、102b、103a、103bが形成されている。分離用流路112には、検出部113が設けられている。装置の外寸法は用途に応じて適宜な値が選択されるが、通常は、図示したように、縦5mm〜5cm、横3mm〜3cmの値とする。試料分離部は、分離用流路112の一部に形成される。その位置は分離効率等を考慮して適切に設定される。たとえば投入用流路111と分離用流路112の交差部の近傍で投入用流路111の下流側に形成すれば、試料の分離が、より効率よく行われる。

【0045】この装置を使って試料の分離を行う方法について説明する。本実施形態において、分離対象の試料は、通常、純水、純水と親水性溶媒の混合液、緩衝液等のキャリア溶媒に溶解ないし分散した形で用いられる。キャリア溶媒としては、水とイソプロピルアルコールの混合液、トリメチルアンモニウム、ホウ酸およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む水溶液、リン酸ナトリウム水溶液等が好適に用いられる。

【0046】分離操作にあたって、まず分離装置内の各流路をキャリア溶媒で満たしておく。次いで、試料を液溜め102a、もしくは液溜め102bに注入する。液溜め102aに注入した場合は、液溜め102bの方向へ試料が流れるように電圧を印加し、液溜め102bに注入した場合は、液溜め102aの方向へ試料が流れるように電圧を印加する。これにより、試料は投入用流路111へと流入し、結果的に投入用流路111の全体を満たす。この時、分離用流路112上では、試料は投入用流路111との交点にのみ存在し、投入用流路111の幅程度の狭いバンドを形成している。

【0047】次に、液溜め102a、液溜め102bの間への電圧印加を停止し、液溜め101aと液溜め101bの間に、試料が液溜め101bの方向へ流れるよう

に電圧を印加する。これにより試料は分離用流路 112 を通過することになり、この間に、分子の大きさと荷電の強さ、および第一の領域間の隙間のサイズに応じた速度で、分離用流路を進んでゆく。その結果、試料中の異なる分子群は、それぞれ異なる速度で移動するバンドに分離される。これらの分離されたバンドは、検出部 113 に至ると、光学的あるいは他の物理化学的な方法で検出される。光学的検出とは、例えば、分子に蛍光物質を結合させておき、検出部 113 においてレーザーを照射し、分子から発せられる蛍光を観測することである。分離されたバンドは、さらに、バンドごとに回収することができる。所望のバンドが検出部 113 を通過したことを目安に、液溜め 101a、液溜め 101b 間への電圧印加をやめ、代わりに液溜め 103a、液溜め 103b の間に電圧を印加する。すると分離用流路 112 中と、回収用流路 114 の交差点に存在するバンドは、回収用流路 114 に流れこむ。液溜め 103a、液溜め 103b 間への電圧印加を一定時間の後に停止すると、液溜め 103a または液溜め 103b に、分離されたバンドに含まれる所望の分子が回収される。

【0048】また、図 18 に示すように、分離装置は毛細管現象を利用して試料を移動させる方式とすることもできる。この場合、電力、圧力等の外力の印加が不要で駆動のためのエネルギーが不要となる。この分離装置は、基板 550 上に分離用流路 540 が設けられ、分離用流路 540 の一端には空気穴 560 が設けられ、他端には分離時にバッファを注入するためのバッファ注入部 510 が設けられている。分離用流路 540 は、バッファ注入部 510、空気穴 560 以外の部分では密閉されている。分離用流路 540 の起始部には、サンプル定量管 530 がつながっており、サンプル定量管 530 の他方の端は、サンプル注入部 520 が設けられている。

【0049】図 20 は、サンプル定量管 530 の近傍を拡大して示したものである。サンプル定量管 530 内部、サンプル保持部 503、およびバッファ導入部 504 には、親水性の吸収領域が設けられる。また分離用流路 540 への導入口付近にも吸収領域 506 が設けられる。サンプル定量管 530 とサンプル保持部 503 との間には、一時停止スリット 502 が設けられている。一時停止スリット 502 は疎水性領域とすることができる。各吸収領域の間は、一時停止スリット 505 および 507 で隔てられている。サンプル保持部 503 の空隙体積は、サンプル定量管 530 の空隙体積と一時停止スリット 502 の体積の和にほぼ等しい。一時停止スリット 505 の幅は、一時停止スリット 502 の幅よりも狭い。ここで、サンプル定量管 530 は、親水性の機能を有し、試料の導入部としての機能が果たせるように構成される。

【0050】次に、図 18 の装置を用いた分離操作の手

順について説明する。まず、サンプル注入部 520 にサンプルを徐々に注入しサンプル定量管 530 を満たす。この時、水面が盛り上がりしないようにする。サンプル定量管 530 がサンプルで満たされた後、サンプルは一時停止スリット 502 に徐々にしみ出してゆく。一時停止スリット 502 にしみだしたサンプルが、サンプル保持部 503 の表面に到達すると、一時停止スリット 502 およびサンプル定量管 530 の内部のサンプルは、さらに毛細管効果の大きい、サンプル保持部 503 へとすべて吸い取られる。ここで、各吸収領域は、親水性材料の選択により、親水性の度合いが異なるように形成され、サンプル保持部 503 は、サンプル定量管 530 よりも大きい毛細管効果を有する。サンプル保持部 503 へのサンプル充填の間は、一時停止スリット 505、507 が存在するため、サンプルがバッファ導入部 504 に流れ込むことは無い。

【0051】サンプル保持部 503 にサンプルが導入された後、バッファ注入部 510 に分離用バッファを注入する。注入されたバッファは、バッファ導入部 504 に一時的に充填されて、サンプル保持部 503 との界面が直線状になる。さらにバッファが充填されると、一時停止スリット 505 にしみだして、サンプル保持部 503 に流入し、さらに、サンプルをひきずりながら、一時停止スリット 507 を超えて分離用流路の方向へと進行する。この際、一時停止スリット 502 の幅が、一時停止スリット 505、507 の幅よりも大きいため、一時停止スリット 502 へバッファが逆流しても、サンプルは既に、サンプル保持部 503 より先に進行しているため、サンプルの逆流はほとんどない。

【0052】分離用バッファは毛細管現象で、分離用流路を空気穴 560 へ向けてさらに進行し、この過程で、サンプルが分離される。分離用バッファが、空気穴 560 に到達すると、バッファの流入が停止する。バッファの流入が停止した段階で、もしくは、バッファが進行中の段階で、サンプルの分離状態を計測する。

【0053】上記実施形態は、毛細管現象を用いた分離装置の例であるが、この原理を利用した試料注入の他の例について図 19 および図 21 を参照して説明する。この装置では、図 18 におけるサンプル定量管 530 に代えて、サンプル投入管 570 が設けられている。サンプル投入管 570 の両端には、サンプル注入部 520 と、排出口 580 が設けられている。

【0054】この装置を用いた分離手順について説明する。まず、サンプルを、サンプル注入部 520 に投入し、排出口 580 まで満たす。この間に、サンプルは、投入部 509 を介してサンプル保持部 503 に吸収される。

【0055】しかる後に、サンプル注入部 520 に空気を圧入して、サンプルを排出口 580 から排出することによりサンプル投入管 570 の内部のサンプルを払拭、

乾燥する。毛細管現象による分離の場合は、上記と同様に、分離用バッファを注入する。電気泳動による分離の場合は、サンプルの投入以前に、バッファ注入口510に相当する液溜め、空気穴560に相当する液溜めから泳動用バッファを導入しておく。広く作られた一時停止スリット505、507が存在するため、サンプル保持部には、流入しない。

【0056】サンプル保持部503へのサンプルの保持が終わった段階で、さらに微量の泳動用バッファを分離用流路の一端の液溜めに加えるか、サンプル保持部503の周辺に軽く振動を与えることで、泳動バッファを連続させ、電圧を印加して分離する。

【0057】次に、分離装置中の分離用流路の構造について説明する。図2は、図1、図18、または図19中の分離用流路112または分離用流路540の構造を詳細に示したものである。図2中、基板701に深さDの溝部が形成され、この溝部に、直径 ϕ の疎水性領域705が等間隔で規則正しく形成されている。本実施形態において疎水性領域705は、疎水基を有するカップリング剤を基板701表面に付着ないし結合することにより形成している。図2には示していないが、流路の上部には通常、蓋を設ける。これにより溶媒の蒸発が抑えられる。また、圧力により流路中の試料を移動せしめることが可能となる。但し蓋を設けない構造とすることも可能である。

【0058】図2中、各部の寸法は、たとえば以下のようにする。

【0059】

W: 10~20ミクロン

D: 50nm~10ミクロン

Φ : 10~1000nm

d: 10nm~10ミクロン

p: 50nm~10ミクロン

各部のサイズは、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、pについては、

(i)細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii)細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物(細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体)と液状分画(細胞質)の分離、濃縮

(iii)液状分画の成分のうち、高分子量成分(DNA、RNA、タンパク質、糖鎖)と低分子量成分(ステロイド、ブドウ糖等)の分離、濃縮

といった処理において、(i)の場合、1 μ m~10 μ m、(ii)の場合、100nm~1 μ m、(iii)の場合、1nm~100nm、とする。また、深さDの大きさは、分離性能を支配する重要な因子であり、分離対象となる試料の慣性半径の1~10倍程度とすることが好ましく、1~5倍程度とすることがより好ましい。

【0060】図3は、図2の構造の上面図(図3

(a))および側面図(図3(b))である。疎水性領

域705は、通常、0.1~100nm程度の膜厚となる。疎水性領域705以外の部分は基板701の表面が露出した状態となっている。基板701としてガラス基板のように親水性材料を選択することにより、図2の構造において、親水性表面上に疎水性表面が所定のパターンをもって形成された構成となり、試料分離機能が発現する。すなわち、キャリア溶媒として上記したような親水性の緩衝液等を用いると、試料は親水性表面上のみを通過し、疎水性表面上は通過しない。このため、疎水性領域705が試料通過の障害物として機能し、試料分離機能が発現するのである。

【0061】次に疎水性領域705のパターン形成による分離方式について、分子サイズに着目して説明する。分離方式として主として2つの方式が考えられる。一つは、図4に示す分離方式である。この方式では、分子サイズが大きい程、疎水性領域705が障害となり、図示した分離部を通過するのに要する時間が長くなる。分子サイズの小さいものは、疎水性領域705間の間隙を比較的スムーズに通過し、分子サイズが大きいものに比べて短時間で分離部を通過する。

【0062】図5は、図4とは逆に大きな分子が早く、小さな分子が遅く流出する方式となっている。図4の方式では、試料中に巨大なサイズの物質を含む場合、このような物質が疎水性領域705の間隙を塞いでしまい、分離効率が低下する場合がある。図5に示す分離方式では、このような問題が解消される。図5中、分離用流路112中に複数の試料分離部706が離間して形成されている。各試料分離部706内には、それぞれ、略同一サイズの疎水性領域705が等間隔に配置されている。

【0063】試料分離部706間には、大きな分子が通り抜けられるような広幅のパスが設けられているため、図4とは逆に大きな分子が早く、小さな分子が遅く流出するようになる。分子サイズが小さいほど、分離領域中でトラップされて長い経路を通ることになる一方、大きいサイズの物質は、隣接試料分離部706間のパスを円滑に通過するからである。この結果、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。サイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過する方式となるので、前述した疎水性領域705間に大きな分子がトラップされて分離効率が低下するといった問題が低減され、分離効率が顕著に改善される。こうした効果をより顕著にするためには、隣接試料分離部706間のパスの幅を、試料分離部706中の疎水性領域705間の間隙よりも大きくするのが良い。パスの幅は、疎水性領域705間の間隙の好ましくは2~200倍程度、より好ましくは5~1000倍程度とする。

【0064】なお、図5の例では、各試料分離部に同じサイズ、間隔の疎水性領域705を形成しているが、それぞれの試料分離部で、異なるそれぞれサイズ、間隔の

疎水性領域 705 を形成してもよい。

【0065】分子サイズの物質を分離する場合、試料分離部間のパスの幅及び、試料分離部内の第一の領域の間隔は、分離しようとする成分（核酸、アミノ酸、ペプチド・タンパク質などの有機分子、キレートした金属イオンなどの分子・イオン）のサイズに合わせて適宜に選択される。たとえば第一の領域の間隔は、試料中に含まれる最小サイズの分子の慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、試料中に含まれる最小サイズの分子の慣性半径と、第一の領域の間隔との差異を、100nm 以内、より好ましくは 50nm 以内、最も好ましくは 10nm 以内とする。第一の領域の間隔を適切に設定することにより、分離能が一層向上する。

【0066】隣接する試料分離部間（パスの幅）は、試料中に含まれる最大サイズの分子の慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、試料中に含まれる最大サイズの分子の慣性半径と試料分離部間（パスの幅）との差異を、当該分子の慣性半径の 10% 以内、より好ましくは 5% 以内、最も好ましくは 1% 以内とする。試料分離部間（パスの幅）が広すぎると、サイズの小さい分子の分離が充分に行われなくなることがあり、試料分離部間（パスの幅）が狭すぎると、目詰まりが発生しやすくなる場合がある。

【0067】また、上記実施形態では疎水性領域を一定間隔で配設した例を示したが、試料分離部内において疎水性領域を異なる間隔で配設することもできる。こうすることで大・中・小等の複数の大きさの分子・イオンを効率的に分離することができる。また、疎水性領域の配置に関し、試料の進行方向に対して互い違いに疎水性領域を配置する方法を採用することも有効である。こうすることにより、目的の成分を効率的に分離することができる。

【0068】本発明の分離装置では、図 6 に示すように、分離用流路 112 の両端に電圧が印加され、これにより試料が分離用流路 112 中を移動する。ここで、試料に外力を与えるための電圧以外に、電気浸透流を抑制するための電圧を印加してもよい。図 6 の構成では、この目的のため、基板にゼータ補正電圧を印加している。このようにすれば電気浸透流が抑制され、測定ピークのブロードニングを有効に防止することができる。

【0069】次に、図 13 に示す分離装置の製造方法について図面を参照して説明する。

【0070】図 13 の分離装置は、図 1 の分離装置に対して、分離回収用流路を省略した構造となっている。この装置では、試料の分離物を分種することは目的とせず、検出部 113 により分離された成分の分析を行うものである。分離用流路 112 中に、試料分離領域が設けられている。この試料分離領域の表面は、2 次元的に略等間隔で配置された複数の疎水性領域と、疎水性領域を

除く試料分離部表面を占める親水性領域とからなっている。

【0071】図 13 の分離装置は、まず、図 7 (a) に示すように、基板 701 表面に溝部 730 を設け、次いで図 7 (b) のように、溝部 730 中の所定箇所に試料分離領域 731 を形成することにより得られる。以下、図 7 (a) の基板 701 上に溝部 730 を形成する工程について図 8 を参照して説明する。なお、本実施例では基板 701 としてガラス基板を用いた例について説明する。

【0072】初めに、基板 701 上にハードマスク 710、レジストマスク 711 を順次形成する（図 8 (a)）。次いで、レジストマスク 711 に所定の開口部を設ける（図 8 (b)）。続いて、開口部を設けたレジストマスク 711 をマスクとしてドライエッチングを行い、図 8 (c) の状態とする。エッチングガスとしては、SF₆ などを用いる。続いて、バッファードフッ酸などのエッチング液を用いて、基板 701 をウェットエッチングする。通常、エッチング深さを 1 μm 程度とする。図 8 (d) は、このエッチングが終了した状態を示す。最後にハードマスク 710 及びレジストマスク 711 を除去する（図 8 (e)）。以上の工程により図 7 (a) に示すような溝部 730 が形成される。

【0073】図 7 (a) における溝部 730 の形成工程において、溝部 730 の表面を親水性とし、それ以外の基板 701 表面を疎水表面とすることもできる。以下、このような構造の形成工程について図 9 を参照して説明する。まず、図 8 (e) で得られた構造に対して、全面に疎水性表面処理膜 720 を形成する（図 9 (a)）。疎水性表面処理膜 720 を構成する材料としては、たとえば、3-チオールプロピルトリエトキシシランが例示される。

【0074】続いて基板表面にレジスト 721 をスピンコート法により塗布・乾燥する（図 9 (b)）。次いで溝部に対応してレジスト 721 に開口部を設ける（図 9 (c)）。次に、開口部を設けたレジスト 721 をマスクとして、ドライエッチングを行う（図 9 (d)）。その後、レジスト 721 をアッシング及び剥離液処理により除去する。以上の工程を実施することにより図 9 (e) の状態となる。すなわち、試料流路溝の内壁は、ガラス材料からなる基板 701 の親水性表面が露出する一方、それ以外の部分は疎水性表面処理膜 720 により覆われた構造となる。このため、キャリア溶媒として親水性溶媒を用いれば、試料が溝の外部に流出することがない。

【0075】続いて、図 7 (b) における試料分離領域 731 の形成工程について図 10 を参照して説明する。初めに、図 10 (a) のように、基板 701 上に電子ビーム露光用レジスト 702 を形成する。続いて、電子ビームを用い、電子ビーム露光用レジスト 702 を所定の

19

形状にパターン露光する(図10(b))。露光部分を溶解除去すると、図10(c)のように所定の形状にパターンニングされた開口部が形成される。その後、図10(d)のように酸素プラズマアッシングを行う。なお、酸素プラズマアッシングは、サブミクロンオーダーのパターンを形成する際には必要となる。酸素プラズマアッシングを行えばカップリング剤の付着する下地が活性化し、精密なパターン形成に適した表面が得られるからである。一方、ミクロンオーダー以上の大きなパターンを形成する場合においては必要性が少ない。

【0076】アッシング終了後、図11(a)の状態となる。図中、親水性領域703はレジスト残さ及び汚染物が堆積して形成されたものである。この状態で、疎水性領域705を形成する(図11(b))。疎水性領域705を構成する膜の成膜法としては、たとえば気相法を用いることができる。この場合、密閉容器中に基板と疎水基を有するカップリング剤を含む液とを配置し、所定時間放置することにより膜を形成する。この方法によれば、基板表面に溶剤等が付着しないため、所望どおりの精密なパターンの処理膜を得ることができる。他の成膜法としてスピンコート法を用いることもできる。この場合、疎水基を有するカップリング剤溶液を塗布して表面処理を行い疎水性領域705を形成する。疎水基を有するカップリング剤としては、3-チオールプロピルトリエトキシシランを用いることができる。成膜方法として、ほかにディップ法等を用いることもできる。疎水性領域705は、親水性領域703の上部には堆積せず、基板701の露出部のみに堆積するため、図3に示すように、多数の疎水性領域705が離間して形成された表面構造が得られる。

【0077】以上述べたプロセスの他、以下のような方法により上記と同様の表面構造を得ることもできる。この方法では、図10(c)のようにパターンニングされた未露光部702aを形成した後、酸素プラズマアッシングを行わずに図12(a)のようにレジスト開口部に3-チオールプロピルトリエトキシシランを堆積して疎水性領域705を形成する。その後、未露光部702aを選択的に除去できる溶媒を用い、ウェットエッチングを行って、図12(b)の構造を得る。この際、溶媒としては、疎水性領域705を構成する膜に損傷を与えないものを選択することが重要である。このような溶媒として、たとえばアセトン等を例示することができる。

【0078】上記実施の形態では、流路溝部に疎水性領域を形成したが、これ以外に以下のような方法を採用することもできる。まず図14(a)、(b)のように二種類の基板を用意する。図14(a)の基板は、ガラス基板901上に3-チオールプロピルトリエトキシシラン等の疎水基を有する化合物からなる疎水性膜903が形成された構成となっている。疎水成膜903は、所定のパターンニング形状にて形成される。この疎水成膜90

20

3の設けられた箇所が試料分離部となる。一方、図14(b)の基板は、ガラス基板902表面にストライプ状の溝が設けられた構成となっている。この溝の部分が試料流路となる。疎水成膜903の形成方法は、上記したとおりである。ガラス基板902表面にストライプ状の溝も上記したとおり、マスクを用いたウェットエッチングにより容易に作製することができる。これらを図15のように張り合わせることによって、本発明に係る試料分離装置を得ることができる。2枚の基板によって形成される空間904が試料流路となる。この方法によれば、平坦な表面に疎水成膜903を形成することになるので、製造が容易であり、製造安定性が良好である。

【0079】カップリング剤膜の作製方法としては、“NATURE, vol. 403, 13, January (2000年)”に記載されているように、LB膜引き上げ法により基板全面にシランカップリング剤からなる膜を形成し、親水性/疎水性のマイクロパターンを形成することができる。

【0080】さらに、本発明において、試料分離領域には一つの疎水性領域のみを設けることもできる。この場合、たとえば、親水性表面を有する分離用流路内に、試料の流れ方向に延在する一つの疎水性領域を形成することもできる。このようにしても、試料が分離用流路を通過する際に、試料分離領域の表面特性によって試料を分離することができる。

【0081】さらに、上述した疎水性処理および親水性処理により流路自体を形成することもできる。

【0082】疎水性処理により流路を形成する場合、ガラス基板など親水性の基板を用いて、流路の壁に相当する部分を疎水性領域で形成する。水は、疎水性領域を避けて進入するため、壁部分の間に流路が形成される。流路はフタを被せても被せなくてもよいが、フタを被せる場合は基板から数 μm の隙間をあけるのが好ましい。隙間は、フタの断端付近をのりしろとして、PDMS (polydimethylsiloxane) やPMMAなどの粘稠性の樹脂をのりとして基板に接着することで実現できる。断端付近だけの接着でも、水を導入すると疎水性領域が水をはじくため、流路が形成される。

【0083】一方、親水性処理により流路を形成する場合、疎水性の基板、もしくはシラザン処理等で疎水性とした基板表面に親水性の流路を形成する。この場合も、親水性領域にのみ水が進入するので親水性領域を流路とすることができる。

【0084】さらに、この疎水性処理、あるいは親水性処理はスタンプやインクジェットなどの印刷技術を用いて行うこともできる。スタンプによる方法では、PDMS樹脂を用いる。PDMS樹脂はシリコーンオイルを重合して樹脂化するが、樹脂化した後も分子間隙にシリコーンオイルが充填された状態となっている。そのため、PDMS樹脂を親水性の表面、例えば、ガラス表面に接触させると、接触した部分が強い疎水性となり水をはじく。これを利

用して、流路部分に対応する位置に凹部を形成したPDMSブロックをスタンプとして、親水性の基板に接触させることにより、前記の疎水性処理による流路が簡単に製造できる。

【0085】インクジェットプリントによる方法では、粘稠性が低いタイプのシリコンオイルをインクジェットプリントのインクとして用い、印刷紙として親水性の樹脂薄膜、例えばポリエチレン、PET、酢酸セルロース、セルロース薄膜（セロハン）などを用いる。流路壁部分にシリコンオイルが付着するようなパターンに印刷することによっても同じ効果が得られる。

【0086】さらに、疎水性処理および親水性処理により、所定形状の疎水性パッチまたは親水性パッチを形成し、特定のサイズ未満の物質を通過させ、特定のサイズ以上の物質を通過させないようなフィルタを流路中に形成することもできる。

【0087】例えば疎水性パッチによりフィルタを構成する場合、パッチを一定の間隔をあけて直線的に繰り返し配置することにより、破線状のフィルタパターンを得ることができる。疎水性パッチどうしの間隔は、通過させたい物質のサイズよりも大きく、通過させたくない物質のサイズよりも小さくする。例えば100 μ m以上の物質を除去したい場合、疎水性パッチどうしの間隔は、100 μ mより狭く、例えば50 μ mに設定する。

【0088】フィルタは、流路を形成するための疎水性領域パターンと、前記、破線状に形成された疎水性パッチのパターンを一体に形成することで実現できる。形成方法としては、前述のフォトリソグラフィとSAM膜形成による方法、スタンプによる方法、インクジェットによる方法等を適宜用いることができる。

【0089】なお、流路中にフィルタを構成する場合、流れ方向に対して垂直にフィルタ面を設けてもよく、流れ方向に平行にフィルタ面を設けてもよい。フィルタ面を流れ方向に平行に設ける場合は、垂直に設ける場合と比べて、物質が詰まりにくく、フィルタの面積を広く取れるという長所がある。この場合、流路部分の幅を広めに、たとえば1000 μ mとし、その中央部分に50 μ m \times 50 μ mの正方形の疎水性パッチを、互いに50 μ mの隙間を有するように流路の流れの方向に形成することで、流路を流れ方向に並行に2分割することができる。分割された流路の一方の側から、分離したい物質を含む液体を導入すると、その液体に含まれる50 μ mよりも大きな物質が除かれた濾液が、他方の流路に流出する。これにより、流路の一方の側で物質を濃縮することができる。

【0090】

【実施例】以下のようにして分離用流路を作製した。まず、顕微鏡用カバーガラス（24mm \times 50mm）を基板として用い、基板の中央部分に長手方向に延在する分離領域（幅10mm \times 長さ50mm）を形成した。分離

領域は、100 μ m \times 100 μ mの正方形の疎水性パッチを、パッチ間の隙間が200 μ mになるように正方形格子に配置して形成した。

【0091】疎水性パッチは以下のようにして形成した。まず、上記カバーガラスの上に、100 μ m \times 100 μ mの正方形をネガレジスト（S1818）を用いた通常のフォトリソグラフィで露光し、正方形部分のレジストを現像除去した。つづいて、その表面を酸素プラズマアッシング（350W、0.5Torr、10分間）した後、シラザン蒸気を用いて露出したカバーガラス面に疎水性のシラザンSAM膜（セルフアセンブル単分子膜）を形成した。その後、レジストをアセトンで除去した。

【0092】このようにして疎水性パッチを形成したカバーガラスを2枚準備した。このうち1枚のカバーガラスを瞬間接着剤を用いて10cm \times 10cmのスライドガラスに貼り付け、分離領域以外の領域に厚さ18 μ mのポリエチレンシートを載せた。つづいてもう1枚のカバーガラスを処理面が互いに対向するようにポリエチレンシート上に配置することにより流路を形成した。

【0093】このようにして形成された分離用流路（幅10mm \times 長さ50mm \times 深さ18 μ m）の一端にピペットにより1 \times TBEバッファを導入した。1 \times TBEバッファは、毛細管効果により自動的に分離用流路内に充填された。

【0094】図16は、1 \times TBEバッファを導入した後に形成された気泡のパターンを示す顕微鏡写真である。疎水性パッチが形成された位置に丸い気泡が形成され、流路断面に気泡が形成されている様子がわかる。気泡と気泡との間隔は、約300 μ であった。

【0095】次に、一般的な細胞と同程度の大きさの物質を用いて上記分離用流路による分離を行った。一般的な細胞の大きさは約1 μ mから10 μ mである。特に血液中の赤血球は ϕ 7.5 μ m、白血球は ϕ 10 μ m、血小板は ϕ 2 μ m、細菌は1 μ mである。本実施例では、 ϕ 1 μ mおよび ϕ 10 μ mの2種類の蛍光ビーズ（ポリサイエンス社製、Fluoresbrite Carboxylate（2.5%Solid-Latex））を用いた。

【0096】つづいて、上記2種類の蛍光ビーズを1 \times TBEバッファに観察に適当な濃度まで適宜希釈してビーズ懸濁液とし、このビーズ懸濁液を1 \times TBEバッファが充填された分離用流路の一方の端に0.50 μ l滴下した。滴下したビーズ懸濁液は、同じく毛細管現象によって、流路中に進入して止まった。顕微鏡により観察したところ、2種類のビーズは大きさの差で明瞭に区別することができた。

【0097】次に、分離用流路の同じ端に、200 μ lの1 \times TBEバッファを一気に滴下した。滴下されたバッファは、分離用流路に自動的に侵入し、他の端から溢れだした。その過程で、流路端にあったビーズ懸濁

液は分離用流路中を押し流されて分離用流路中を移動した。ビーズ懸濁液が移動する様子を CCD カメラで観察した。

【0098】1×TBE バッファーを投入して時間が経つと、 $\phi 10 \mu\text{m}$ のビーズが流路底面に沈んでしまうため、投入から 3 秒間のビーズが浮遊している間に観察し、評価を行った。

【0099】図 17 に、ビーズが衝突する様子を示す。ビーズは、図中右から左の方向に約 $300 \mu\text{m}/\text{秒}$ で移動している。2 種類のビーズとも、気泡以外の部分では流れに乗ってほぼ同じ速さで運動していたが、疎水性パッチ上の気泡に衝突すると、ともに一時停止した。その後、気泡を回りこむように流れてゆくが、その移動スピードは気泡以外の部分の流れの速度よりも 3 分の 1 程度に減少した。これにより、疎水性パッチとその上に形成された気泡によりビーズの運動が阻害されていることがわかる。ビーズが気泡を回り込む速度は、サイズの大きい $\phi 10 \mu\text{m}$ のビーズ（図中、1 で示す）の方が明らかに遅く、サイズの小さい $\phi 1 \mu\text{m}$ のビーズ（図中、2 で示す、ここで、シャッタースピードの関係で筋状に見える）の 3 分の 2 程度であった。これにより、疎水性パッチへの衝突によって、ビーズの大きさによる速度差が生じるといふ分離効果が示される。疎水性パッチを、さらに密なパターンとして、ビーズの衝突頻度を増加させれば、その分離効果はさらに顕著になると考えられる。

【0100】以上の実施例の結果により以下のことが示された。

(i) 疎水性表面処理によるパッチ（疎水性パッチ）の上に気泡が形成される。

(ii) ビーズは、パッチ上の気泡の内部には進入できず、疎水性パッチ上の気泡が流路中の障害物としての機能を果たす。

(iii) サイズの異なる 2 種類のビーズとも、疎水性パッチ上の気泡との接触によって移動速度が低下する。

(iv) サイズの違いによりビーズの移動速度が異なる。（大きいビーズの方がサイズの小さいビーズの移動速度よりも速度が低下する。）従って、サイズの違いによりビーズを分離することができる。

【0101】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、試料分離部の表面に親水性領域および疎水性領域からなるパターンが形成されており、その表面特性によって試料の分離が行われる。すなわち、試料分離部の表面に離間して形成される親水性領域または疎水性領域が篩としての機能を有し、これにより目的の成分が効率的に分離される。この際、試料の分離が、試料のサイズおよび極性によって行われるため、従来にない優れた分離性能を実現することができる。また、表面加工によって試料分離部を形成できるので、製造安定性に優れる。また、表面

特性によって分離がなされるので、試料が少量で済み、分離に要する時間も短時間となる。さらに、目詰まりの問題が解消される上、使用後、試料分離部の表面に洗浄液を流す等の方法によってきわめて容易に洗浄することができる。したがって、高精度の分離特性と優れた操作性の両方が実現される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明に係る分離装置の一例を示す図である。

【図 2】図 1 中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

【図 3】図 1 中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

【図 4】試料の分離方式を説明するための図である。

【図 5】試料の分離方式を説明するための図である。

【図 6】電気浸透流を調節するための補正電圧の印加方法を示す図である。

【図 7】本発明に係る分離装置の概略構造を示す平面図である。

【図 8】本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

【図 9】本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

【図 10】本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

【図 11】本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

【図 12】本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

【図 13】本発明に係る分離装置の概略構造を示す平面図である。

【図 14】本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための図である。

【図 15】本発明に係る分離装置の概略構造を示す断面図である。

【図 16】分離用流路の疎水性パッチが形成された位置に形成された気泡のパターンを示す顕微鏡写真である。

【図 17】分離用流路においてビーズが衝突する様子を示す図である。

【図 18】分離装置の他の例を示す図である。

【図 19】分離装置の他の例を示す図である。

【図 20】図 18 に示した分離装置のサンプル定量管の近傍の拡大図である。

【図 21】図 19 に示した分離装置の詳細図である。

【符号の説明】

101 a、b 液溜め

102 a、b 液溜め

103 a、b 液溜め

110 基板

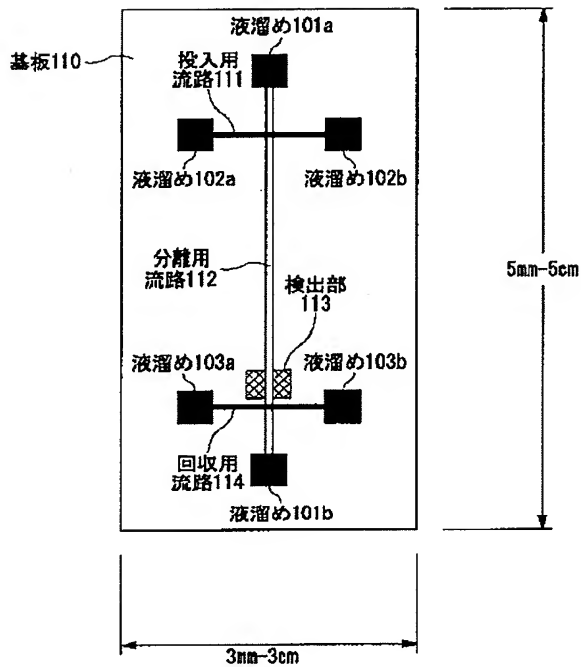
111 投入用流路

112 分離用流路

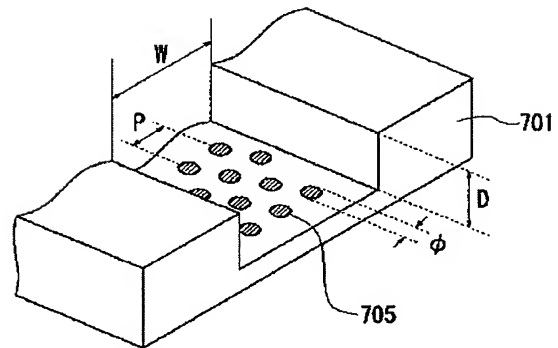
- 113 検出部
- 114 回収用流路
- 502 一時停止スリット
- 503 サンプル保持部
- 504 バッファ導入部
- 505 一時停止スリット
- 506 吸収領域
- 507 一時停止スリット
- 509 投入穴
- 510 バッファ注入口
- 520 サンプル注入口
- 530 サンプル定量管
- 540 分離用流路
- 550 基板
- 560 空気穴
- 570 サンプル投入管
- 580 排出口

- 701 基板
- 702 電子ビーム露光用レジスト
- 702a 未露光部
- 702b 露光部
- 703 親水性領域
- 705 疎水性領域
- 706 試料分離部
- 710 ハードマスク
- 711 レジストマスク
- 10 720 疎水性表面処理膜
- 721 レジスト
- 730 溝部
- 731 試料分離領域
- 902 ガラス基板
- 903 疎水性膜
- 904 空間

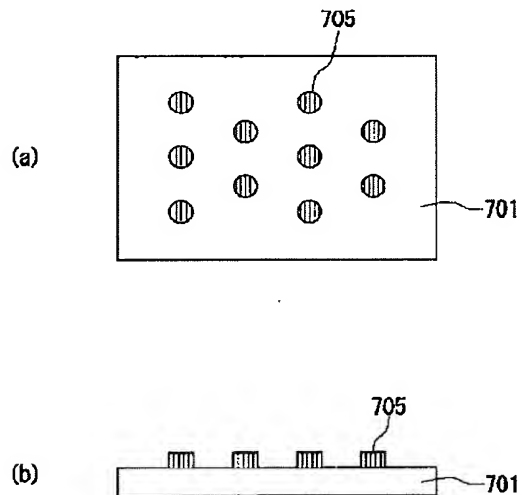
【図1】



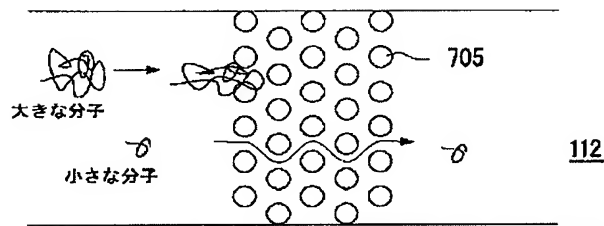
【図2】



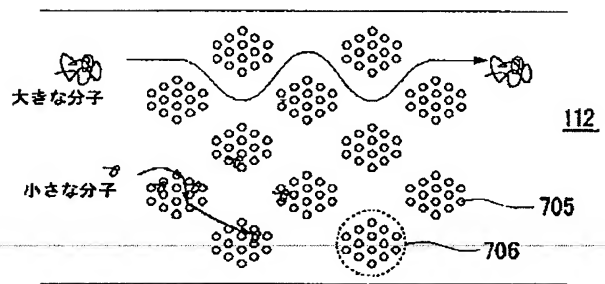
【図3】



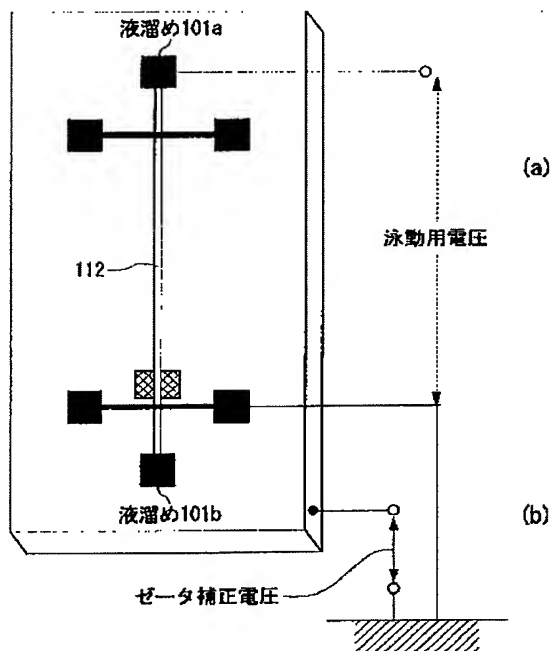
【図 4】



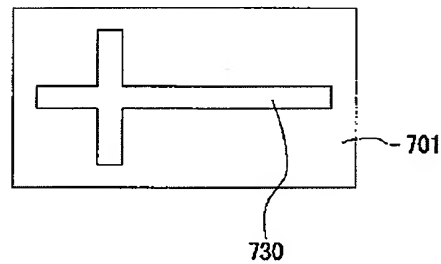
【図 5】



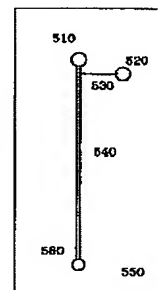
【図 6】



【図 7】



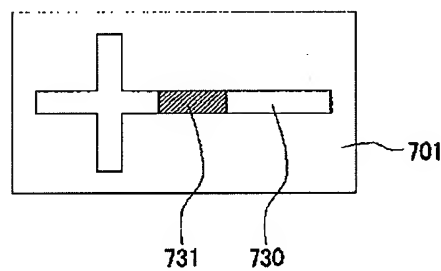
【図 18】



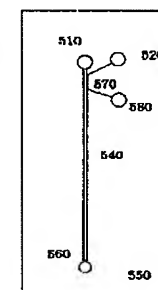
(a)

(b)

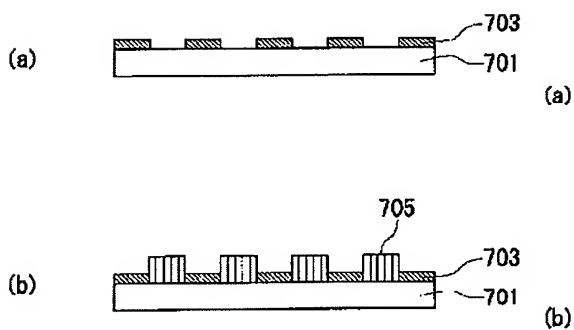
【図 12】



【図 19】

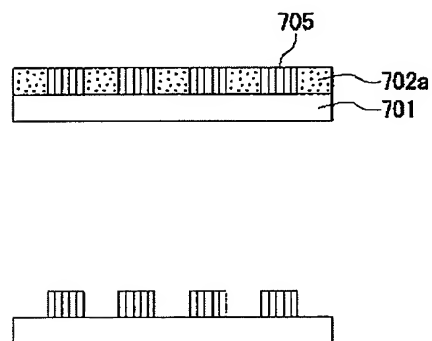


【図 11】

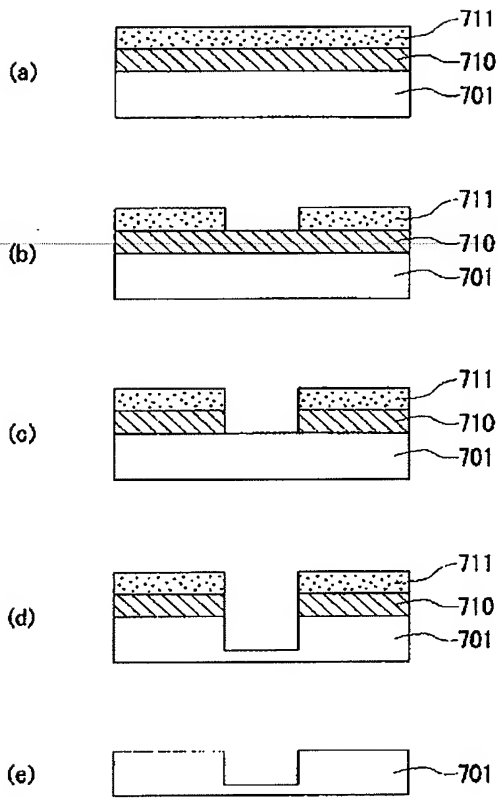


(a)

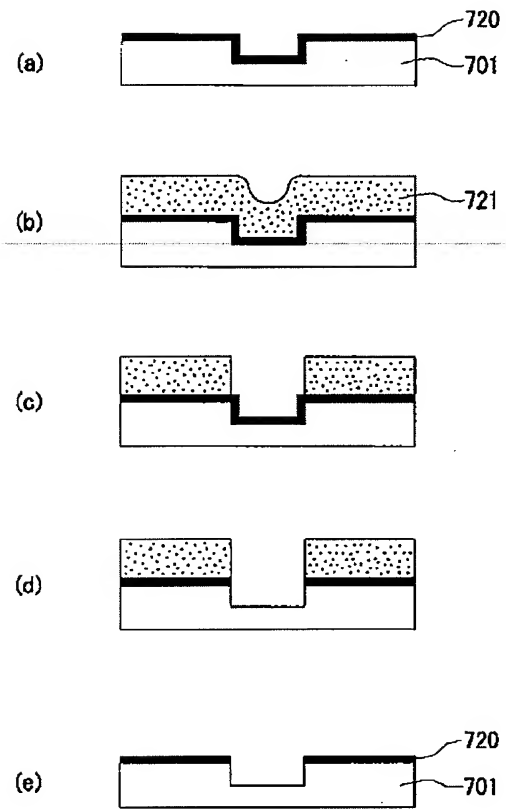
(b)



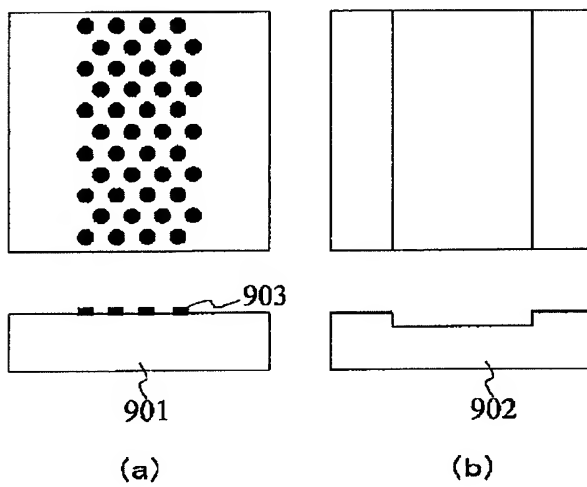
【図 8】



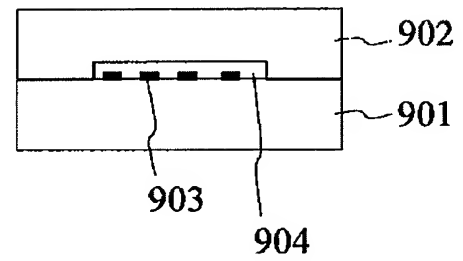
【図 9】



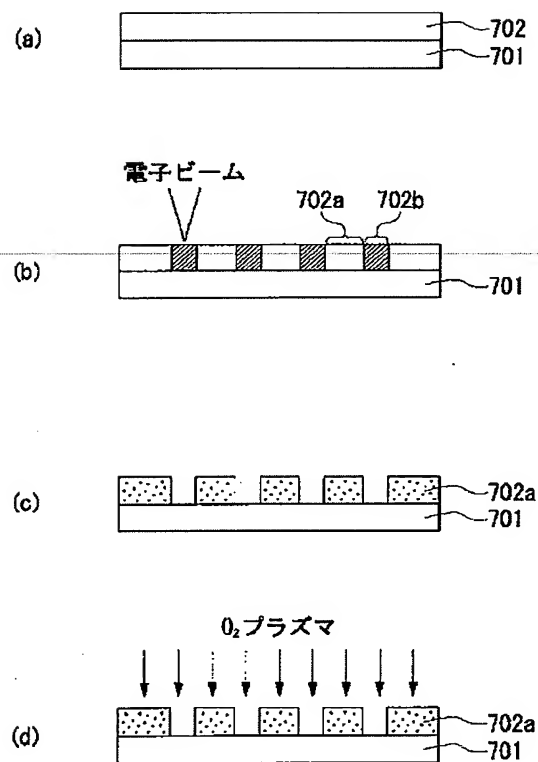
【図 14】



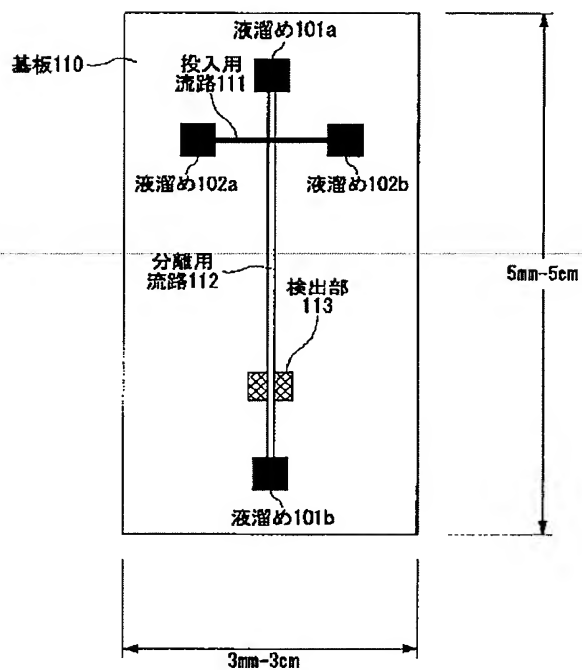
【図 15】



【図 10】



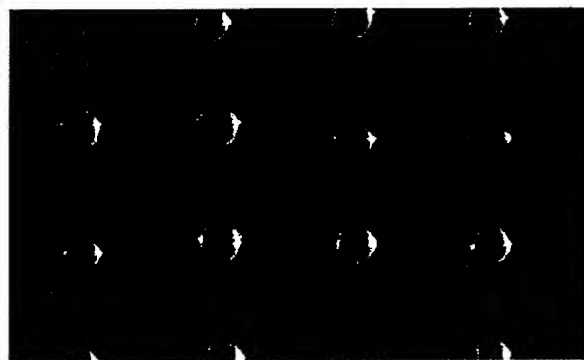
【図 13】



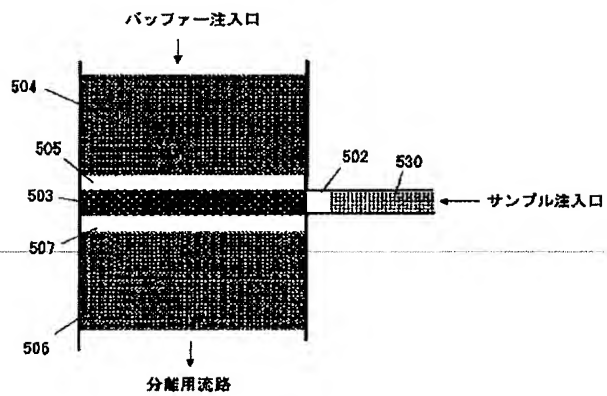
【図 17】

← ビーズの流れ

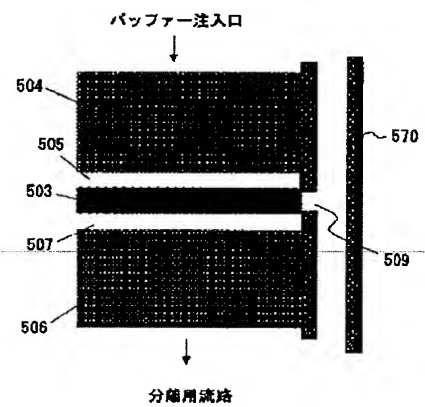
【図 16】



【図 20】



【図 21】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

G 0 1 N 37/00

識別記号

1 0 1

F I

G 0 1 N 27/26

ターマコード (参考)

3 3 1 Z

3 3 1 E

(72) 発明者 川 浦 久 雄

東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株
式会社内

(72) 発明者 佐 野 亨

東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株
式会社内

(72) 発明者 阪 本 利 司

東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株
式会社内

(72) 発明者 井 口 憲 幸

東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株
式会社内

(72) 発明者 染 谷 浩 子

東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株
式会社内